Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. N. Henning

Vorkommen und Bedeutung der direkten Heterohämagglutination bei Virushepatitis

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von **Ursula Sperling** aus Solingen

1963

Dekan: Prof. Dr. Windorfer

Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der Prüfung: 30. Juli 1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sonderdruck

Zeitschrift für

GASTROENTEROLOGIE

Klinik und Praxis der Verdauungskrankheiten

Herausgeber: N. Henning, Erlangen, Krankenhausstraße 12

Schriftleitung: K. Heinkel und H. Schön, Erlangen, Krankenhausstraße

Verlag: Karl Demeter, Gräfelfing/München, Würmstraße 13

Jahrgang 1 (1963) Heft 4 Seite 351—357

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Professor Dr. N. Henning)

Vorkommen und Bedeutung der direkten Heterohämagglutination bei Virushepatitis

von W. FRENGER, F. SCHEIFFARTH und U. SPERLING

Die Erkennung der Agglutination von Hühnererythrozyten durch Influenzavirus *[8,15]* wirkte ebenso befruchtend auf die Diagnostik wie auf die Grundlagenforschung der Viruskrankheiten. Es hatte sich gezeigt, daß das von den Viren selbst abgegebene Virushämagglutinin ein Mukoproteid mit besonderer Affinität zu den neuraminsäurehaltigen Rezeptoren der Erythrozyten verschiedener Tierspezies darstellt (siehe bei *Klenk [12]*). In jüngerer Zeit beobachteten *Hoyt* und *Morrison [9,18]*, daß auch Erythrozyten von Macacus Rhesus – vorher war dies schon für Hammelerythrozyten in einem gewissen Prozentsatz bekannt – durch Seren von Kranken mit Virushepatitis agglutiniert werden. Diese Heterohämagglutinationsreaktion wies brauchbare diagnostische Ergebnisse bei der Virushepatitis auf. Hinsichtlich des Reaktionsmechanismus wurde angenommen, daß Viren sich durch einen enzymatischen Vorgang mit der Neuraminsäure der Erythrozytenrezeptoren direkt verbinden und so zur Agglutination führen *[19]*. Das Hämagglutinin wäre demnach Teil des Virus selbst, wie dies vom Influenzavirus und anderen Viren bekannt ist *[20]*. Demgegenüber nehmen *Hoyt* u. Mit. *[10]* sowie *Jennings* und *Hindmarsh [11]* an, daß das Hämagglutinin ein Serumantikörper von γ-Globulinnatur ist, der mit dem Serumagglutinin bei der infektiösen Mononukleose vergleichbar ist.

Es wurde festgestellt, daß die Hepatitisvirus-Hämagglutination auch mit den Erythrozyten von jungen Hühnern möglich ist; und daß deren Ergebnisse eine größere diagnostische Aussage erlauben *[16,17,21]*.

In den eigenen Untersuchungen sollte die Brauchbarkeit der Hühnererythrozyten-Agglutination für die Differentialdiagnose der Leberkrankheiten geprüft werden; zum anderen sollte versucht werden, den hämagglutinierenden Serumfaktor weiter zu charakterisieren.

Material und Methodik

Blut von Kranken mit entzündlichen und nichtentzündlichen, akuten und chronischen Leberkrankheiten sowie von anderen Kranken und Gesunden wurde nüchtern entnommen. Das gewonnene Serum wurde bis zur baldigen Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Kasuistik: 28 Fälle mit akuter Hepatitis, 12 Fälle mit aktiver chron. Hepatitis, 12 Fälle mit Leberzirrhose und 14 Fälle mit nicht entzündlichen Leberkrankheiten. Die Seren von 45 anderen Kranken sowie Gesunden dienten als Kontrollen.

Das Blut von frischgeschlachteten jungen Hühnchen wurde ungerinnbar gemacht und nach Zentrifugation das überstehende Plasma verworfen. Für den weiteren Versuch wurden die Erythrozyten mit einem Sörensen-Puffer plasmafrei gewaschen. Verwendet wurden Erythrozyten, die nicht älter als 8 Tage waren. Hühnererythrozyten verwandten wir auf Grund der Empfehlungen von *Morris* und *Nakamura [17]* sowie *McCollum* u. Mit. *[16]*, die diesen gegenüber den Rhesuserythrozyten den Vorzug

geben. Im weiteren hielten wir uns an die Technik von *Hoyt et al. [9]* und *McCollum et al. [16]*. Als Puffer diente ein solcher nach *Sörensen* mit einem physiologischen pH. Die Testreihe wurde mit dem inaktivierten Probandenserum in geometrischer Verdünnung angesetzt und nach Abschluß für 2 Stdn. in den Kühlschrank eingestellt. Die Untersuchungen nahmen wir mehrfach im Krankheitsablauf – in zeitlicher Regelmäßigkeit – vor.

Einen Teil der untersuchten Seren extrahierten wir mit Azeton. Nach Zentrifugation wurde das Dekantat verworfen und der weißliche Niederschlag mehrfach mit Azeton gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat im ursprünglichen Volumen wiederum in Puffer gelöst. Die Reaktion mit dem Azetonpräzipitat wurde wie in allen anderen Fällen nach Hitzeinaktivierung des Serums angesetzt.

Bei einer weiteren Serumgruppe wurde ein Kältepräzipitat gewonnen, indem das Serum 1 : 14 mit Aq. dest. verdünnt und 72 Stdn. im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Nach anschließender Zentrifugation in der Kälte wurde das abgesetzte Präzipitat im ursprünglichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung gelöst und weiter verwendet.

Neben diesen Untersuchungen wurden einige Eigenschaften des Hämagglutinin geprüft, so die Adsorptionsfähigkeit, das Verhalten in Wärme und nach Konservierung des Serums und die optimale p_H-Wirksamkeit.

Die erhaltenen Agglutinintiter wurden mit dem klinischen Krankheitsbild und den weiteren Laboratoriumsergebnissen in Beziehung zu setzen versucht.

Ergebnisse

1. *Normalhämagglutinintiter:* Unter 45 Patienten ohne Viruskrankheiten konnte in den meisten Fällen ebenfalls eine Hämagglutination beobachtet werden. Der Titer lag hier jedoch sehr niedrig, nämlich bei 2,09 ($\log_2$) bzw. 1 : 4. Dieser Wert muß als Normaltiter gelten. In vorliegendem Zusammenhang wurden Titer von mehr als 1 : 16 ($\log_2$ 4), mindestens 2 Stufen höher als der Normalwert, als sicher pathologisch angesehen und verwertet.

2. *Untersuchungsergebnisse bei Leberkrankheiten:* Die Ergebnisse bei Leberkrankheiten sind in Tab. 1 aufgeführt (positives Ergebnis mit einem Titer von mehr als 1 : 16, Wertung von mehr als einer positiven Bestimmung im Krankheitsablauf).

Tabelle 1

Diagnose	Anzahl der Fälle	Ergebnisse negativ	Ergebnisse positiv	% positive Reaktion
Akute Hepatitis	28	5	23	82,1
Chronische Hepatitis	12	2	10	83,3
Leberzirrhose	12	4	8	66,6
Fettleber	10	5	5	50,0
Verschlußikterus	4	4	0	0
Kontrollfälle	45	41	4	8,8

Das Verhalten des Hämagglutinintiters bei den entzündlichen Leberkrankheiten und der Leberzirrhose zeigt Abbildung 1. Aufgezeichnet sind die Mittelwerte der jeweiligen Krankheitsgruppe im Krankheitsablauf. Nach dem Verlauf der Kurve bleibt der Agglutinintiter bei akuter Hepatitis relativ lange erhöht (Mittelwerte im pathologischen Bereich). Bei chronischer Hepatitis kann man eine bleibende Titererhöhung feststellen. Die Leberzirrhose liegt mit ihren Titerwerten teilweise im Grenzbereich vom Normalen zum Pathologischen; das Verhalten ist jedoch nicht einheitlich.

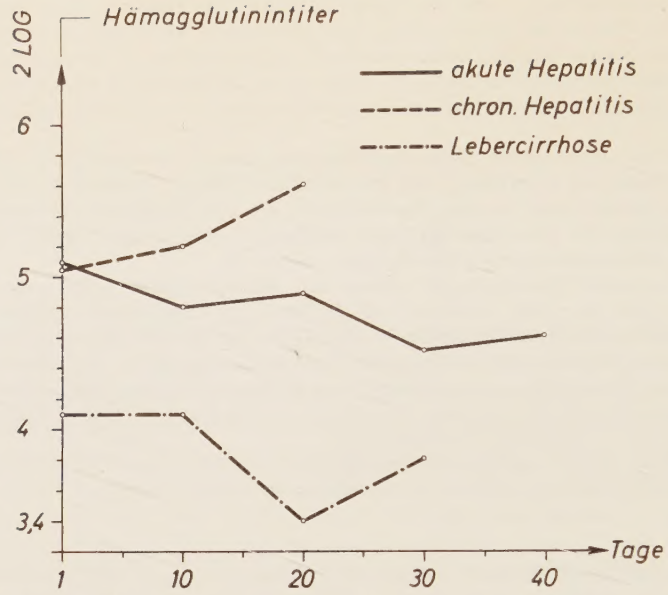

Abbildung 1: Heterohämagglutinintiter bei akuten und chronischen virusbedingten Leberkrankheiten und der Leberzirrhose (Mittelwertskurven).

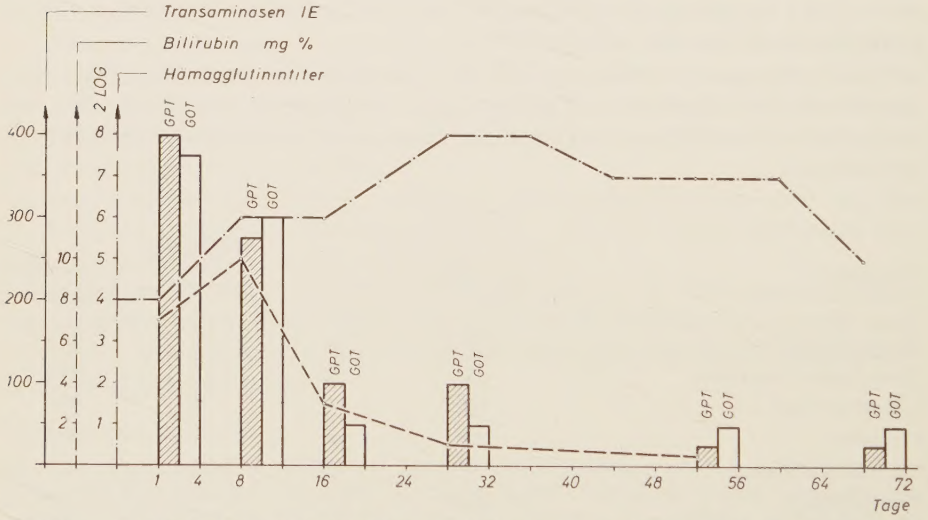

Abbildung 2: Zeitliches und quantitatives Verhalten von Enzymreaktionen, Bilirubin und Heterohämagglutinin bei einer akuten Hepatitis.

Im Ablauf der akuten Hepatitis tritt eine Vermehrung des Hämagglutinins ein, die häufig noch vorhanden ist (Abb. 2), wenn sich Bilirubin und Transaminasen bereits normalisiert haben. Im akuten Schub der chronischen Hepatitis zeigt sich ein ähnliches Bild. Im einen Fall (Abb. 3) trat dagegen mit dem Rückgang des erhöhten Bilirubins und der Transaminasenaktivität auch eine Normalisierung des Hämagglutinintiters ein. Dies ist jedoch nicht die Regel.

3. Im Azetonniederschlag von 10 Seren wurde der Hämagglutinintiter bestimmt. Signifikant höhere Werte als im Nativserum konnten hierbei nicht ermittelt werden.

4. Im Kältepräzipitat, das vorwiegend β_2-M-Globuline des Serum enthält, wurde in 18 Fällen ein im Durchschnitt etwa 1 Stufe niedrigerer Titer als im entsprechenden Nativserum festgestellt; keinesfalls lag dieser höher. (Tab. 2).

Tabelle 2

Kältepräzipitat des Serum von Fällen mit akuter Hepatitis

Serum	Hämagglutinintiter ($\log_2$)		Unterschied in Stufen
	Nativserum	Kältepräzipitat	
1	9	7	− 2
2	4	3	− 1
3	6	4	− 2
4	3	2	− 1
5	3	−	− 3
6	2	−	− 2
7	4	3	− 1
8	1	2	+ 1
9	3	1	− 2
10	8	8	−
11	7	7	−
12	4	3	− 1
13	4	4	−
14	3	2	− 1
15	3	2	− 1
16	5	4	− 1
17	3	1	− 2
18	5	4	− 1
N = 18	$\bar{x}$ = 4,2	3,1	−1,1 Stufen

5. *Eigenschaften des Hämagglutinins*

a) Absorptionsfähigkeit

Seren (N)	Hämagglutinintiter ($\log_2$, $\bar{x}$)		Unterschied (Titerstufen)
	vor Absorption	nach Absorption	
14	6,9	2,6	4,3

b) Temperaturabhängigkeit des Hämagglutinintiters

Seren (N)	Hämagglutinintiter ($\log_2$, $\bar{x}$)		Unterschied (Titerstufen)
	4° C	37° C	
11	7,7	2,9	4,8

c) Beeinflussung des Hämagglutinintiters durch Konservierung bei $-20°$ C.

Seren (N)	Hämagglutinintiter ($\log_2$, $\bar{x}$) vor Konservierung	Hämagglutinintiter ($\log_2$, $\bar{x}$) nach Konservierung (6–8 Monate später)	Unterschied (Titerstufen)
21	7,2	3,3	3,9

d) Günstiger pH-Bereich für die Hämagglutination: Zwischen 6,2 und 7,2.

Diskussion

Die Ergebnisse der Hühnererythrozyten-Agglutination lassen auf die Anwesenheit eines Heterohämagglutinin in verschieden hoher Serumkonzentration bei akuter und chronischer Hepatitis schließen. Bei der Leberzirrhose sowie bei degenerativen und sekundären Leberkrankheiten ist der Anteil erhöhter Hämagglutinin-Konzentrationen deutlich geringer. Diese Ergebnisse sind mit den in der Literatur niedergelegten Erfahrungen *[7,9,14–19,21]* unter Verwendung von Macacus-Rhesus-Blut wie auch Hühnererythrozyten gut in Einklang zu bringen. Es hat sich bereits früher gezeigt *[11,14]*, daß mit dieser Reaktion kein spezifischer Antikörper nachgewiesen wird; vor allem deshalb, weil man das Hämagglutinin auch bei nicht virusbedingten Krankheiten und bei Gesunden nachweisen kann, wenn auch der Titer weit niedriger liegt *[17]*. Nach den eigenen Ergebnissen an Seren der Kontrollgruppe liegt der Normaltiter im Mittel bei 1 : 4; andere sehen einen Titer bis 1 :8 als normal an; dagegen dürfte eine Normaltiterbewertung von 1 : 40 *[6,19]* unseres Erachtens zu hoch liegen. In Übereinstimmung mit den meisten Autoren glauben wir, einen Hämagglutinintiter ab der Serumverdrängung von 1 : 16, mindest aber ab 1 : 32 als sicher pathologisch betrachten zu müssen. Solche und höhere Titerwerte finden sich offenbar ganz überwiegend bei der Virushepatitis *[4,14,21]*. In den eigenen Untersuchungen ermittelten wir Werte bis 1 : 1024. Zweckmäßigerweise sollte man mehrfache Bestimmungen im Verlaufe der Krankheit vornehmen, um ein falsch negatives Ergebnis auszuschließen.

Die Hämagglutination durch das Serum von Viruskranken läßt zunächst daran denken, daß die Reaktion durch ein Virushämagglutinin unmittelbar hervorgerufen wird *[19]*. Bekanntlich vermag eine Reihe von Viren durch Abgabe eines Agglutinin Zellen, insbesondere Erythrozyten, direkt, d. h. ohne Vermittlung eines Serumfaktors, zu agglutinieren *[12,20]*. Bei diesem Virushämagglutinin handelt es sich meist um ein Mukoproteid, das eine Affinität zu den chemisch verwandten Rezeptoren der Erythrozytenmembran aufweist. Für das Hepatitis-Hämagglutinin nehmen *Hoyt* u. Mit. *[10]* sowie *Szécsey* und *Dóbiás [21]* an, daß die Agglutination nicht durch ein Virushämagglutinin, sondern durch ein Serum-γ-Globulin zustande kommt. Dafür spricht besonders die Tatsache, daß das Hämagglutinin auch unter normalen Verhältnissen nachgewiesen werden kann *[4]*, also nicht spezifisch ist. Auch seine Absorptionsfähigkeit spricht in diesem Sinne. Andererseits ergibt sich in der Tatsache, daß die Hämagglutination unter Wärmeeinwirkung (37° C) stark vermindert ist, eine gewisse Stütze für die Virusgenese. Bei Anreicherung der β- und γ-Globuline,

etwa durch Azetonfällung oder im Kältepräzipitat, waren in den eigenen Untersuchungen keine höheren Agglutinintiter in diesen Präzipitaten festzustellen, im Kältepräzipitat eher ein niedrigerer Titer. Inhibitoren der Reaktion können demnach – entgegen der Meinung von *Morris* und *Nakamura [17]* – zumindest im hitzeinaktivierten Serum keinen Einfluß haben.

Bei der Virushepatitis findet sich in nahezu allen Fällen eine mehr oder minder deutliche Vermehrung der β_2-M-Globuline *[6 u. a.]*, die bei der elektrophoretischen Trennung für gewöhnlich mit der γ-Globulingruppe erfaßt werden. Diese hochmolekularen Globuline führen neben spezifischen Antikörpern weitere Faktoren, die zu verschiedenen Seroreaktionen, insbesondere in Form der Agglutination, Anlaß geben. Es sind dies in der Hauptsache die Kälteagglutinine, das Mononukleose-Heterohämagglutinin und der Rheumafaktor. Vor allem kann der Rheumafaktor in höherer Konzentration auch in Hepatitisseren festgestellt werden *[2,3,13]*. Dieser Serumfaktor ist ebenfalls als Heteroagglutinin wirksam. Bei den virusbedingten Leberkrankheiten läßt sich, wie die eigenen Ergebnisse und die in der Literatur niedergelegten Erfahrungen zeigen, neben den genannten ein weiteres Heteroagglutinin nachweisen, das eine hühnererythrozytenagglutinierende Fähigkeit besitzt. Die beschriebene Nachweismethode ist ihrem Wesen nach mit der Heterohämagglutinationsreaktion bei infektiöser Mononukleose nach *Hanganutziu-Deicher [1,5]* vergleichbar.

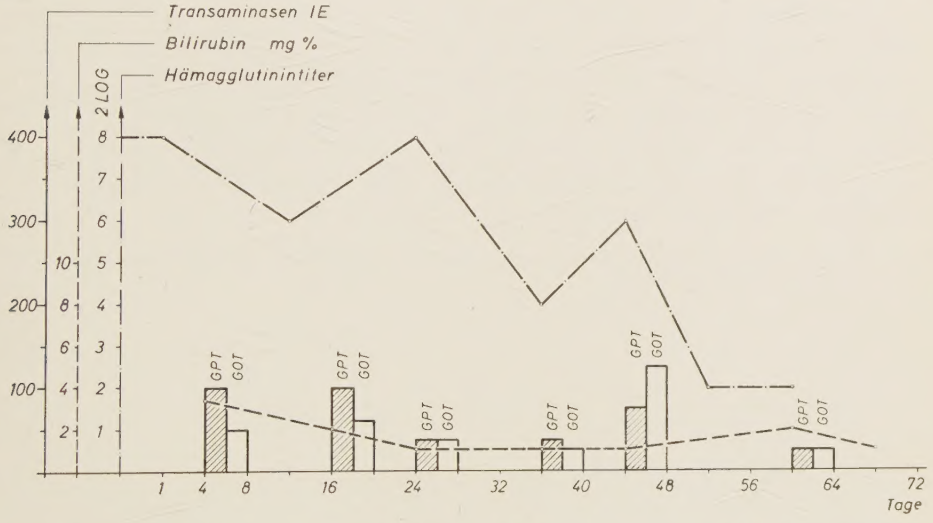

Abbildung 3: Zeitliches und quantitatives Verhalten von Enzymaktivitäten, Bilirubin und Heterohämagglutinin im akuten Schub einer chronischen Hepatitis.

Was leistet die neue Hämagglutinationsreaktion für die Klinik? Die Vermehrung dieses Agglutinin scheint für die akute und rezidivierende chronische Hepatitis in hohem Maße charakteristisch, wenn auch nicht spezifisch zu sein *[11]*. Da die Reaktion beim Verschlußikterus, wie die bisherigen Ergebnisse – allerdings mit noch zu kleiner Zahl – zeigen, in der Regel normal bzw. negativ ausfällt *[21]*, lassen sich mit dieser technisch einfachen Methode differentialdiagnostische Schlußfolgerungen ziehen. Mit Beginn der Virushepatitis tritt relativ

rasch eine Titersteigerung des Hämagglutinin ein, die nach unseren und den Erfahrungen von *Havens [7]* häufig länger anhält als die Transaminasen- und Bilirubinerhöhung (Abb. 1 und 2). Ob ein persistierender hoher Hämagglutinintiter im Ablauf der akuten Hepatitis Schlüsse auf einen Übergang in chronische Hepatitis zuläßt, kann bisher nicht sicher festgestellt werden. Auch bei der chronischen Hepatitis ist eine pathologische Hämagglutininkonzentration zu erwarten (Abb. 1). Der Mittelwert der hier untersuchten Fälle mit chronischer Hepatitis zeigt aber eher eine ansteigende Tendenz im Gegensatz zum dargestellten Einzelbeispiel (Abb. 3), wo mit der klinischen Remission unter intensiver Kortikoid-Behandlung auch eine Normalisierung des Hämagglutinintiters eintrat. Leberzirrhose und Fettleber ließen kein einheitliches Verhalten im Hämagglutinationstest erkennen. Für die Leberzirrhose muß man feststellen, daß der Hämagglutinintiter keineswegs mit der Serum-γ-Globulinvermehrung parallel geht, wie dies etwa bei einer Immunisierung der Fall ist. Auch die Ausschaltung möglicher Inhibitoren durch Fällung der γ-Globuline im Kältepräzipitat führte zu keiner weiteren Steigerung des Hämagglutinintiters.

Literatur

1. *Deicher, H.:* Z. Hygiene *106* (1926) 561. – 2. *Dóbiás, G., G. Szécsey* und *S. Bozsóky:* Z. Immun. forsch. *123* (1962) 231. – 3. *Frenger, W.:* Kongr. Ges. Labor. Med. Freiburg 1963. – 4. *Haas, R.:* Med. Klin. *1963*, 161. 5. *Hanganutziu, M.:* C. r. Soc. Biol. (Paris) *91* (1924) 1457. – 6. *Hartmann, L., S. Filitti-Wurmser, N. Lelièvre-Ardaillon et P. Boivin:* Sang *31* (1960) 491. – 7. *Havens, W. P.:* Amer. J. Med. *32* (1962) 665. – 8. *Hirst, K. G.:* Science *94* (1941) 22. – 9. *Hoyt, R. E., L. M. Morrison:* Proc. Soc. Exper. Biol. Med. *93* (1956) 547. – 10. *Hoyt, R. E., L. M. Morrison* and *M. G. Levine:* J. Lab. Clin. Med. *58* (1961) 104. – 11. *Jennings, E. R.* and *C. Hindmarsh:* J. Lab. Clin. Med. *55* (1960) 519. – 12. *Klenk, E.:* Z. angew. Chemie *72* (1960) 482. – 13. *Lindner, H., A. Taubner, V. Sachs* und *G. Klein:* Med. Welt *1962*, 957. – 14. *Mattila, S.:* Ann. med. exp. Fenn. *38* (1960) 243. – 15. *McClelland, L.* and *R. Hare:* Canad. J. Publ. Health *32* (1941) 530. – 16. *McCollum, R. W., V. Bech, P. Isacson* and *J. T. Riordan:* Amer. J. Med. *27* (1959) 703. – 17. *Morris, J. A.* and *K. Nakamura:* J. Lab. Clin. Med. *55* (1960) 726. – 18. *Morrison, L. M.* and *R. E. Hoyt:* J. Lab. Clin. Med. *49* (1957) 774. – 19. *Rubin, B. A., H. A. Kemp* and *H. D. Bennett:* Science *126* (1957) 1117. – 20. *Schäfer, W.:* Behringwerk-Mitt. *35* (1958) 33. – 21. *Szécsey, G.* und *G. Dóbiás:* Z. Immun. Forsch. *124* (1962) 11.

Dr. W. Frenger, Prof. Dr. F. Scheiffarth, U. Sperling, Med. Universitätsklinik Erlangen, Krankenhausstr. 12.

Lebenslauf!

Am 31. 10. 37 wurde ich in Solingen als Tochter des Dr.-Ing. habil. Roland Wasmuht und seiner Ehefrau Dr. med. Marie-Charlotte, geb. Rinck, geboren. In Dortmund, wo ich die Volksschule und das Gymnasium besuchte, bestand ich 1957 das Abitur. Im Anschluß daran studierte ich Medizin an den Universitäten München, Münster, Tübingen und Erlangen. An der Universität zu Erlangen bestand ich am 21. 7. 63 das Medizinische Staatsexamen. Seit dem 31. 12. 62 bin ich mit dem Gerichtsreferendar Klaus Sperling verheiratet. Augenblicklich bin ich als Medizinal-Assistentin am städtischen Krankenhaus in Ulm/Do. beschäftigt.